第24卷 第3期　　昆 虫 学 报　　Vol. 24, No. 3
1981年8月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1981

家蚕卵巢单层细胞培养及其病毒感染试验

谢天恩　张光裕　岑英华　张英莲
(中国科学院武汉病毒研究所)

家蚕卵巢单层细胞培养应用于病毒研究已有一些报道 (Gaw Zan-yin 等, 1959, Vaughn 等 1963; Raghow 等 1974)。本文主要采用不同昆虫血淋巴、乳牛血清、鸡血清配制的培养液和人工培养液培养家蚕卵巢细胞,比较观察其细胞生长特性,并研究家蚕核型多角体病毒在培养细胞中发育与温度的关系。

材料与方法

供试家蚕 (*Bombyx mori* L.) 的品种为云文。体表用70%乙醇溶液消毒; 蛹的卵巢管用0.1%胰蛋白酶 (Difco, 1:250) 液消化; 昆虫血淋巴和乳牛血清等均经热处理灭活; 培养液是在 Wyatt 基础液 (Wyatt, 1956) 中分别加入10%的家蚕、蓖麻蚕、粘虫的血淋巴和乳牛血清、鸡血清制成; 采用单层细胞培养法 (谢天恩等, 1979)。

结果与讨论

一、家蚕卵巢单层细胞培养　经0.1%胰蛋白酶液消化卵巢管后获得的细胞,悬浮于含有10%家蚕血淋巴制备的培养液中,分装于克氏瓶(直径1.5厘米)或药瓶内, 在28℃恒温下培养30—45分钟后, 部分细胞能附着瓶壁,继续培养2—3天,可以形成细胞单层(图版:1), 培养物中有上皮样细胞、成纤维细胞和不同阶段的有丝分裂细胞(图版:2)

细胞量与生长的关系　使用10、20、30、40、50、80、100、150、200、250及300万个细胞/毫升等浓度进行多次试验表明,每毫升培养液中含有10、20及30万个细胞,生长不良, 40—300万个细胞/毫升都能生长,但以50—100万个细胞/毫升生长最好。

细胞生长与温度的关系　每毫升培养液含有50—100万个细胞, 25—28℃培养生长良好, 30℃细胞还能生长,但在32—34℃时细胞生长不良或不易生长,温度过低(17℃)细胞也不易生长。

二、不同昆虫血淋巴和血清培养液培养家蚕卵巢细胞的比较　含有家蚕血淋巴的培养液中家蚕卵巢细胞生长最好, 具有特殊的适应性。含有蓖麻蚕血淋巴的培养液内培养的细胞大多数是上皮样细胞(图版:3)。含有乳牛血清、鸡血清和粘虫血淋巴的培养液培养的细胞,以成纤维细胞居多(图版:4)。这种现象是由于血清或血淋巴的营养成分不同而引起细胞形态的变化, 还是某些细胞仅对不同的血清或血淋巴适应,而对另一些不适应导致不易生长呢? 如果是后者,那么可利用某些血清或血淋巴制备的培养液筛选对病毒敏感的细胞群以及建立不同类型的细胞株,这是非常有意义的。

三、人工培养液培养家蚕卵巢细胞　人工培养液的配方是: 在 Wyatt 基础液中加入0.4%乳蛋白水解物和0.1%混合氨基酸(内含有10种L-型氨基酸) pH:6.4。

使用这种人工培养液培养家蚕卵巢细胞获得生长。培养的细胞体积略大, 核质分明,贴壁较牢,多为上皮样细胞。一般培养3天左右形成细胞单层(图版:5)。鲇沢啓夫等 (1961) 采用 Wyatt 基础液中的无机盐和糖类,然后加入0.75%乳蛋白水解物和0.1%酵母粉。用以培养家蚕卵巢细胞获得的结果

本文于1978年10月收到。

与我们的实验有相似之处，但也有不同的地方。相似的是两种人工培养液培养家蚕卵巢细胞都能生长；不同的是鲇沢啓夫等用悬滴培养法，生长的细胞属成纤维细胞，而我们是用单层细胞培养法，培养的细胞主要为上皮样细胞。

四、家蚕核型多角体病毒感染卵巢细胞的观察　选择生长良好的家蚕卵巢单层细胞，除去旧培养液，用 Wyatt 基础液洗涤细胞 1—2 次，然后接种家蚕核型多角体病毒悬液 0.1 毫升，培养液 0.9 毫升，轻轻混匀后置 28℃ 培养。3 天后可以观察到在细胞核内形成多角体（图版：6），数量由少而多，直至充满整个细胞核。核逐渐扩大最终细胞裂解，多角体释出。

病毒在细胞中的发育与温度有密切关系，以稀释 100 倍的病毒悬液接种家蚕卵巢细胞，分别置于 28℃、17℃、5°—8℃ 培养（每组 5 瓶）。28℃ 培养的只需要 71 小时全部培养瓶中的细胞都形成了多角体。而在 17℃ 培养的，接种后第 11 天有 67% 的培养瓶中的细胞出现多角体，直到第 14 天全部培养瓶中出现多角体。5—8℃ 组连续观察 20 天，细胞核中始终未看到多角体的形成。

参　考　文　献

谢天恩　张光裕　王学兰　岑英华　张英莲，1979 核型多角体病毒在家蚕卵巢单层细胞中复制的超微结构研究. 病毒学集刊、国庆卅周年献礼专辑，49—53。

鲇沢啓夫・佐藤文子・村上昭雄，1961 蚕の組織培養における体液の役割，日蚕雑，**30**：445。

Gaw zan-yin, Liu Nien-tsui, Zia Tien-un. 1959 Tissue culture methods for cultivation of virus grasseric. *Acta virol*. **3** (Suppl.): 55—60.

Vaughn, J. L. and P. Faulkner, 1963 Susceptibility of an insect tissue culture to infection by virus preparations of the nuclear polyhedrosis of the silkworm (*Bombyx mori* L.), *Virology* **20**: 484—9.

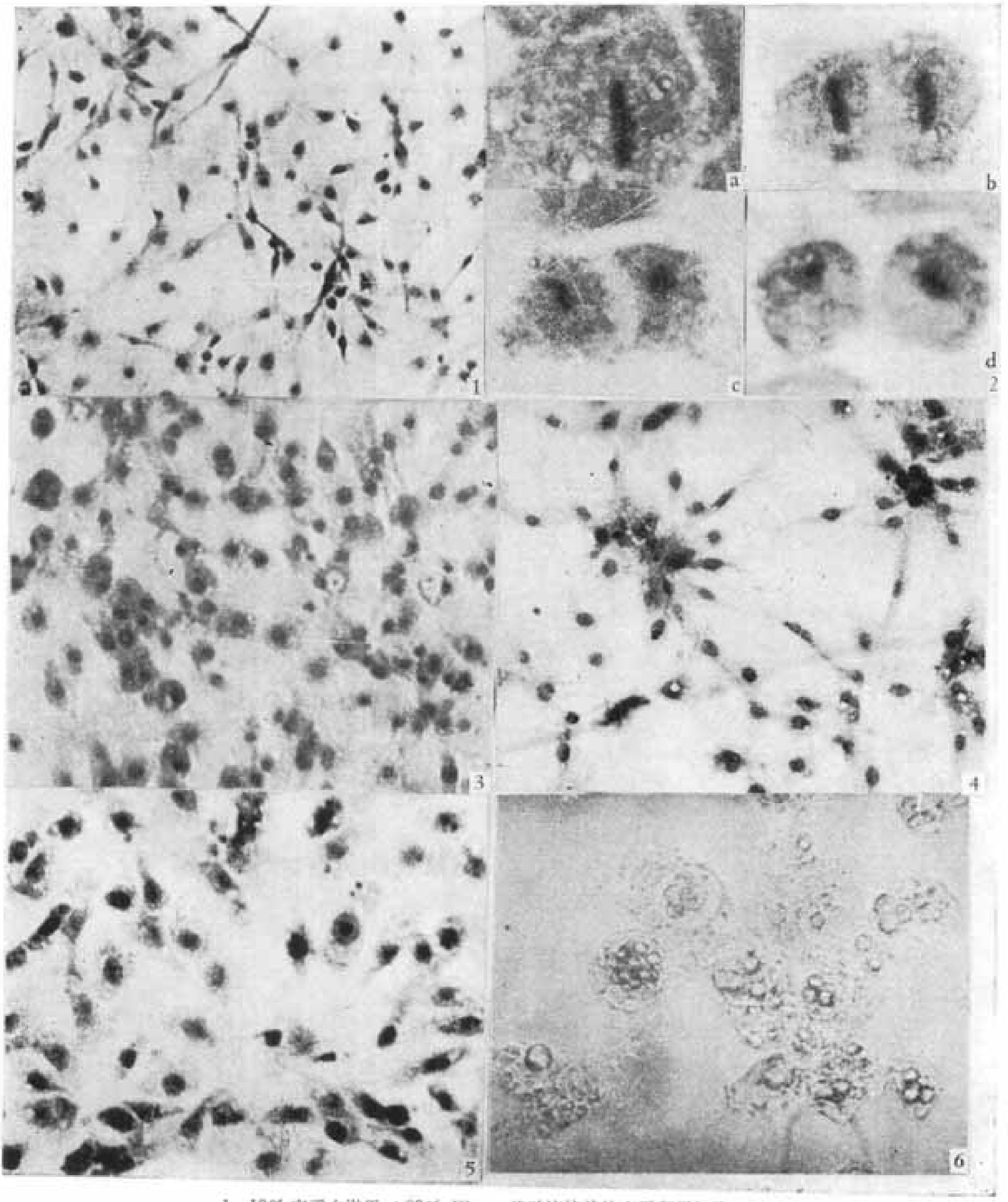
Raghow, R. and T. D. C. Grace 1974 Studies on a nuclear polyhedrosis virus in *Bombyx mori* cells in vitro: 1, Multiplication kinetics and ultrastructural studies. *J. Ultrastruct. Res*. **47**(3): 384—99.

Wyatt, S. S, 1956 Culture in vitro of tissues from the silkworm *Bombyx mori* L., *J: Gen. Physiol*. **39**: 841—52.

SILKWORM OVARIAN MONOLAYER CELL CULTURE AND VIRUS INFECTION

Xie Tien-un　Zhang Guang-yu　Tsing Ying-hua　Zhang Ying-lian

(Wuhan Institute of virology, Academia Sinica)



1. 10% 家蚕血淋巴 +90% Wyatt 基础液培养的家蚕卵巢细胞。
2. 培养的家蚕卵巢细胞有丝分裂的不同阶段。
   a. 中期　b. 后期　c. 末期　d. 分裂成两个子细胞。
3. 10% 蓖麻蚕血淋巴 +90% Wyatt 基础液，培养的家蚕卵巢细胞。
4. 10% 乳牛血清 +90% Wyatt 基础液，培养的家蚕卵巢细胞。
5. 人工培养液培养的家蚕卵巢细胞。
6. 家蚕核型多角体在培养的家蚕卵巢细胞中的形成。